

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-42691

⑤Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑬公開 昭和63年(1988)2月23日
C 12 P 13/00		7236-4B	
A 23 J 7/00		7236-4B	
/(C 12 P 13/00			
C 12 R 1:66)			
(C 12 P 13/00			
C 12 R 1:38)			
(C 12 P 13/00			
C 12 R 1:845)			
(C 12 P 13/00			
C 12 R 1:785)			

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭発明の名称 リン脂質の改質方法

⑰特 願 昭61-184292

⑱出 願 昭61(1986)8月7日

⑲発 明 者	八 木 隆	千葉県柏市つくしヶ丘2-4-5	つくしフラット1階
⑲発 明 者	町 田 芳 章	東京都江戸川区松江1-9-10	1102
⑲出 願 人	昭和産業株式会社	東京都千代田区内神田2丁目2番1号	
⑲代 理 人	弁理士 中 島 敏		

#### 明 細 書

##### 1、発明の名称

リン脂質の改質方法

##### 2、特許請求の範囲

(1) リン脂質にアスペルギルス属またはシュードモナス属に属する微生物、リゾプス・ジャバニカス、リゾプス・ニベウスおよびムコール・ミーハイのうちの一つが生産するリパーゼを作用させ、その少なくとも一部をリゾ型リン脂質とすることを特徴とするリン脂質の改質方法。

(2) アスペルギルス属に属する微生物がアスペルギルス・ニガーまたはアスペルギルス・ウェンチである特許請求の範囲第(1)項記載のリン脂質の改質方法。

(3) シュードモナス属に属する微生物がシュードモナス・フルオレッセンスまたはシュードモナス・フレイジである特許請求の範囲第(1)項記載のリン脂質の改質方法。

##### 3、発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、リン脂質にリパーゼを作用させ、その少なくとも一部をリゾ型リン脂質とすることからなるリン脂質の改質法に関する。

(従来の技術)

リゾ型リン脂質とはリン脂質のグリセリン残基に結合した脂肪酸の一部を加水分解して得られる部分分解リン脂質である。かかるリゾ型リン脂質は、水溶性が増加してO/W型の乳化性が強くなり、また、カルシウムやマグネシウム等のイオンが高濃度に共存しても乳化力が低下しない等、優れた特性が付与されることが報告されており(J. Amer. Oil Chem. Soc., 53, 425, 1976)、このものの応用例としてはミルクリプレーサー(文献上記)、マヨネーズの熱安定性の改良(J. Sci. Food Agric., 32, 451, 1981)、製パン改良剤(特開昭60-30644)などが知られている。

リン脂質をリゾ型リン脂質に変えるための加水分解の手段には酸、アルカリ等を用いる化学的方法と酵素を用いる方法とがあるが、化学的方法は

分解反応に特異性がないためリゾ型リン脂質の収率が低く、また、反応には高温を必要とし分解生成物が着色する等の不都合があり、現在では殆ど顧みられていない。

リン脂質を分解する酵素としてホスホリパーゼが知られている。該酵素はその作用部位によって更に細分類され、このうちリン脂質をリゾ型リン脂質に分解するにはグリセロール残基の1位および2位に結合した脂肪酸をそれぞれ選択的に加水分解する、ホスホリパーゼA<sub>1</sub>、またはA<sub>2</sub>、もしくは1位および2位の両方を加水分解するホリホリパーゼB活性を有するもののうち、いずれかが必要とされる。

ホスホリパーゼAあるいはB活性を有する酵素は、蛇毒や蜂毒中に存在することが古くから知られているが、この他にはすい臓リパーゼ、リゾプス・デレマー (*Rhizopus delema*r)・リゾプス・アルヒズ (*R. arrhiz*us) やムコール・ジャバニカス (*Mucor javanicus*) 等の少数の微生物起源のリ

パーゼに、その活性の存在が報告されているのに過ぎない。現在、酵素を利用してリン脂質を分解したリゾ型リン脂質も一部市販されているが、これは豚すい臓リパーゼを用いたものであり、微生物起源のリパーゼを用いるリン脂質の改質は未だ工業的に行われていない。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明は、工業的に入手可能な微生物起源のリパーゼにつき広く検索を行って、リン脂質をリゾ型リン脂質に分解することができる、強いホリホリパーゼAあるいはB活性を有するリパーゼ剤を見出し、もって酵素を用いたリン脂質のリゾ型リン脂質への改変による改質に実用化の道を開こうとするものである。

(発明の構成)

本発明は、リン脂質にアスペルギルス属またはシュードモナス属に属する微生物、リゾプス・ジャバニカス (*Rhizopus javanicus*) リゾプス・ニベウス (*Rhizopus niveus*) およびムコール・ミーハイのうち

- 3 -

の一つが生産するリパーゼを作用させ、その少なくとも一部をリゾ型リン脂質とすることを特徴とするリン脂質の改質方法である。アスペルギルス属に属する微生物としてはアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) またはアスペルギルス・ウエンチ (*Aspergillus wentii*) が、シュードモナス属に属する微生物としてはシュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) またはシュードモナス・フレイジ (*Pseudomonas fragi*) の生産するリパーゼが、高いホスホリパーゼ活性を有するので特に有利である。これらの微生物の生産する酵素は市販されているものも多く、本発明においてもこれらを利用することができる。

これら微生物から取得したリパーゼ剤のホスホリパーゼ活性は、その起源によりリン脂質の1位脂肪酸を優先的に加水分解するものと、1および2位脂肪酸の両方をほぼ均一に加水分解するものとがあり、前者の例としてはアスペルギルス・ニ

- 4 -

ガー、リゾプス・ジャバニカス、同ニベウスの生産するリパーゼがあり、後者の例としてはシュードモナス・フルオレッセンス、同フレイジがある。リゾ型リン脂質のみを多量に生成させるためには、前者タイプのリパーゼを使用するのが有利である。

かかる酵素を作用させてリゾ型リン脂質を得るためのリン脂質原料としては、例えば大豆レシチン、卵黄レシチン等の動植物起源の市販レシチンの他、植物油の精製工程の一つである脱ガム工程で得られる、所謂抽出油滓をも用いることができる。反応は、水、または酵素に至適なPHの緩衝液にリン脂質1～50重量%の濃度に分散し、この分散液にリン脂質1g当たり、山田らの方法[日本農芸化学会誌36, 860, 1962]により測定したリパーゼ活性が1～10000ユニットに相当する量のリパーゼを加え、反応液を揺動させつつ20～60℃、より好ましくは25～40℃で3～24時間反応させるのがよい。

所定時間経過した反応液は、例えば製パンへの

利用ではこれをそのまま生地 of 混捏水として使用することもできるが、一般的には必要に応じ加熱等によりリパーゼを失活せしめ、更に必要に応じ薄層濃縮等の適宜の濃縮機による濃縮、更には噴霧乾燥、凍結乾燥等の適宜の乾燥手段を施して、濃縮もしくは乾燥製品とすることもできる。

以下実施例により具体的に説明する。

#### (実施例)

##### 実施例 1

リン脂質 1—パルミトイル 2—オレイルホスファチジルコリン 10 mg および表 1 に挙げた各微生物起源の市販リパーゼ剤 400 ユニットを、0.1 M リン酸緩衝液 (PH 7.0) 1 ml に分散し、37℃で恒温槽中で攪はんしつつ 3 時間反応させた。経時後反応液を凍結乾燥し、このもののクロロホルム—メタノール (2:1) 抽出液に内部標準物質としてステアリン酸 2 mg を加え、シリカゲル薄層板にスポットして、クロロホルム:メタノール:水 (60:30:3) を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行った。展開後、遊離脂肪

酸区分およびリゾホスファチジルコリン区分をそれぞれ掻き取り、前者については三フッ化メタノール法で脂肪酸をメチルエステル化後、ガスクロマトグラフィーによりパルミチン酸とオレイン酸の定量を行い、後者についてはこれを過塩素酸分解後リンの定量を行ってリゾホスファチジルコリンの生成量を算出した。結果を表 1 にまとめる。

表 1

起源微生物	生成量 (mol%)	遊離脂肪酸組成 (mol百分率)
[酵素剤名 (上段) リゾPC (メーカー)]	(下段) 遊離脂肪酸	(上段) パルミチン酸 (下段) オレイン酸
アスペルギルス・ニガー	8.7	7.5
[リパーゼ A (天野製薬)]	10.2	2.5
アスペルギルス・ウエンチ	2.5	6.0
培養液 *	4.0	4.0
シュドモナス・フルオレックス	2.1	4.9
[リパーゼ P (天野製薬)]	9.7	5.1
シュドモナス・フレイジ	1.0	5.5

- 7 -

[リパーゼ B サッポロ (サッポロビール)]	4.0	4.5
リゾプス・ジャパニカス	1.2	8.5
[リパーゼ F (天野製薬)]	1.3	1.5
リゾプス・ニベウス	3.0	8.2
[長瀬リパーゼ (長瀬産業)]	3.5	1.8
ムコール・ミーハイ	4.2	6.3
[リパーゼ SP-225 (米国ノボ社)]	5.9	3.7
キャンディダ・シリンドラセア	0	—
[リパーゼ MY (名糖産業)]	0	—
クロモバクテリウム・ビスコサム	0	—
[リパーゼ (東洋醸造)]	0	—
アースロバクター・コアリアファシエンス	4	4.8
[リパーゼ AU (新日本化学)]	1.6	5.2

\* 1 F O 8 8 6 4 菌株を H. C h a n d e r r a (J. Food Sci. 45, 598, 1980) に準じて培養、菌体を遠心除去したもの。

表 1 に見られるように、本発明に係るアスペルギルス属およびシュドモナス属に属する微生物、リゾプス・ジャパニカス、同ニベウス、ムコール

- 8 -

・ミーハイから取得したリパーゼ剤は、いずれもホスホリパーゼ活性を有し、リン脂質 1—パルミトイル 2—オレイルホスファチジルコリンに作用してリゾ型リン脂質であるリゾホスファチジルコリン (表中リゾ PC と略記) を生成した。

一方、キャンディダ・シリンドラセア、クロモバクテリウム・ビスコサム、アースロバクター・ユーリアファシエンス等の生産するリパーゼにはホスホリパーゼ活性が殆どないか、あるいは極めて微弱なものであり実用化の可能性はなかった。

また、ホスホリパーゼ活性を有するリパーゼ剤においても、その作用機作によってリゾホスファチジルコリン生成能にかなりの差があり、リゾ型リン脂質を多量に生成させるには、特にリン脂質の 1 位脂肪酸を優先的に分解するタイプ (表 1 中の遊離脂肪酸組成の欄でパルミチン酸 (1 位脂肪酸) がオレイン酸 (2 位脂肪酸) より多いもの) のリパーゼ剤の使用が好ましいことが示唆された。

##### 実施例 2

大豆リン脂質 (独スターンケミー社製スターン

パー P M) の 10% (W/W) 緩衝液\*分散液 50g に表 2 記載の微生物起源のリパーゼ各 1000 ユニットを加え、ロータリーシェーカー中 37℃ で 24 時間反応させた。

\*緩衝液

シュードモナス・フルオレッセンス、同フレイジ、リゾプス・ジャバニカス、同ニベウス生産の酵素剤については 0.1 M リン酸緩衝液 (PH 7.0)、アスペルギルス・ニガー生産の酵素剤については 0.1 M 酢酸緩衝液 (PH 5.6) を使用。

経時後、凍結乾燥を行い、そのクロロホルム-メタノール抽出物につき、クロロホルム-メタノール-水 (65:25:4) およびブタノール-酢酸-水 (60:20:20) の 2 種の展開溶媒を用いた二次元薄層クロマトグラフィーを行った。ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、リゾホスファチジルコリン (リゾ PC) およびリゾホスファチジルエタノールアミン (リゾ PE) の各区分を掻き取り、

それぞれにつき過塩素酸分解後リンの定量を行ってこれらの組成比を求めた。結果を表 2 に示す。

表 2 に見るように、基質に大豆リン脂質を用いた場合にも、本発明に係る微生物起源のリパーゼはいずれもリゾ型リン脂質を生成するが、

(リゾ PC + リゾ PE) / (PC + PE + リゾ PC + リゾ PE)

で算出した「リゾ化率」は、アスペルギルス・ニガーが最も大きく、以下リゾプス・ジャバニカス、ムコール・ミーハイ、リゾプス・ニベウス、シュードモナス・フルオレッセンスおよび同フレイジの順で、リゾ型リン脂質を得るには 1 位脂肪酸に優先的に作用するタイプのリパーゼの使用が望ましいという先の実施例 1 の結果を裏付けるものであった。

表 2. 大豆リン脂質リパーゼ分解物の組成 (%)

起源 微生物	リゾ		リゾ		リゾ化率 B+D A+B+C+D
	PC (A)	PC (B)	PE (C)	PE (D)	

- 11 -

酵素剤名 (メーカー)					
未分解 大豆リン脂質	23.0	0.8	26.5	0.7	0.03
アスペルギルス・ニガー [リパーゼ A (天野製薬)]	4.0	13.5	1.0	4.10	0.78
シュードモナス フルオレッセンス [リパーゼ P (天野製薬)]	19.1	3.3	28.6	2.0	0.10
シュードモナス・フレイジ [リパーゼ B サッポロ (サッポロビール)]	22.8	1.9	24.1	1.5	0.07
リゾプス・ジャバニカス [リパーゼ F (天野製薬)]	7.3	10.5	16.6	5.1	0.39
リゾプス ・ニベウス [長瀬リパーゼ]	11.5	7.9	14.4	5.9	0.35

- 12 -

(長瀬産業)]					
ムコール・ミーハイ	9.4	9.4	15.3	4.2	0.36
[リパーゼ SP-225 (米国ノバ社)]					

注)

PC: ホスファチジルコリン、

リゾ PC: リゾホスファチジルコリン、

PE: ホスファチジルエタノールアミン、

リゾ PE: リゾホスファチジルエタノールアミン

表 3. 卵黄リン脂質リパーゼ分解物の組成 (%)

起源 微生物	リゾ		リゾ		リゾ化率 B+D A+B+C+D
	PC (A)	PC (B)	PE (C)	PE (D)	
酵素剤名 (メーカー)					
未分解 卵黄リン脂質	72.3	0.9	23.8	0.9	0.02
アスペルギルス・ニガー [リパーゼ A]	28.7	20.3	8.2	3.7	0.39

〔天野製薬〕					
シェードモナス フルオレッセンス	41.4	5.0	13.0	1.5	0.09
〔リパーゼP 〔天野製薬〕〕					
シェードモナス・フレイ	61.1	3.7	18.3	1.8	0.06
〔リパーゼBサッポロ 〔サッポロビール〕〕					
リゾプス・ジャパニカス	58.6	7.7	15.5	4.1	0.41
〔リパーゼF 〔天野製薬〕〕					
リゾプス ・ニベウス	51.8	10.2	17.9	3.5	0.16
〔長瀬リパーゼ 〔長瀬産業〕〕					
コーラル・ミーハイ	52.4	7.4	15.0	2.8	0.13
〔リパーゼSP-225 〔米国ノボ社〕〕					

注) PC: ホスファチジルコリン、

リゾPC: リゾホスファチジルコリン、

- 15 -

もリパーゼによる分解反応が正常に行われることが分かった。

表4. 実施例4のリパーゼ分解物の組成(%)

PC	リゾPC	PE	リゾPE	リゾ化率
(A)	(B)	(C)	(D)	(B+D)/(A+B+C+D)
8.0	8.1	7.2	5.9	0.48

#### 実験例5

本発明の方法で得た分解物の乳化力を次のとおり試験した。

本発明の方法によるリン脂質として実験例4で得た酵素分解物の凍結乾燥品を、対照区として未分解大豆レシチンを、各々試料とし、試料各0.5gと表5に記載の各濃度の塩化カルシウム水溶液5mlを試験管にとり、日音医理科器械製作所製ホモジナイザー「ヒスコトロン」で4.5mmのシャフトを用い10,000rpm、2分間分散させ、乳化状態を観察した。。

PE: ホスファチジルエタノールアミン、

リゾPE: リゾホスファチジルエタノールアミン

#### 実施例3

実施例2の大豆リン脂質を卵黄リン脂質(和光純薬工業製 卵製レシチン、生化学用)に、リパーゼ使用量を3000ユニットに、それぞれ代えた以外は実施例2と同様に操作して、表3の結果を得た。本発明に係る微生物起源のリパーゼは卵黄リン脂質にも作用してリゾ型リン脂質を生成することが確認された。反応の傾向は大豆リン脂質のそれと略同様であった。

#### 実施例4

実施例2で使用したのと同じの大豆リン脂質の20%(W/W)水分散液50gにアスペルギルス・ニガー起源のリパーゼ剤(天野製薬リパーゼA)2000ユニットを加え、ロータリーシェーカー中37℃で24時間反応させた。

反応液を実施例2に準じて分析した結果は、表4に示すとおりであり、高濃度水分散液において

- 16 -

表5

Ca濃度(mM)	0	10	20	40	60
実験例4による 酵素分解物	○	○	○	△	×
未分解大豆レシチン	○	○	×	×	×

○: 均一に乳化

×: 乳化せず

△: 均一に乳化するが数分で分離

以上のように、本発明による酵素処理レシチンは、未処理レシチンでは乳化力が殆どないイオン強度の高い系においても優れた乳化力を発現することが示された。

#### (発明の効果)

本発明によれば、工業的に入手が可能な市販の微生物起源のリパーゼ剤を用い、広範な原料リン脂質をリゾ型リン脂質に改質することができる。該リゾ型リン脂質は特に水系分散媒における乳化性に優れた物質であり、このものを安価に提供することを可能とした本発明は、特に食品工業を中

心に産業面に多大の貢献を果たすものである。

特許出願人 昭和産業株式会社

代理人 中 島

